

Aus dem Institut für Anatomie der Freien Universität
Berlin (Direktor: Prof. Dr. med. Willy Schwarz).

.....

Morphometrische Analyse der Wirkungen einer einmaligen
Applikation von Actinomycin D und/oder Cyclophosphamid
am 12. Entwicklungstag auf die intrauterine Entwicklung
des Skeletts von Wistarratten.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen der
Freien Universität Berlin
vorgelegt von
Hans-Christian Siegert
aus Helmstedt.

.....

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533901_0007

Aus dem Institut für Anatomie der Freien Universität
Berlin (Direktor: Prof. Dr. med. Willy Schwarz).

.....

Morphometrische Analyse der Wirkungen einer einmaligen
Applikation von Actinomycin D und/oder Cyclophosphamid
am 12. Entwicklungstag auf die intrauterine Entwicklung
des Skeletts von Wistarratten.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Christian Siegert

aus Helmstedt.

.....

1. Referent: Prof. Dr. med. Milan Pospisil

2. Referent: Prof. Dr. med. Helmut Kewitz

Tag der Promotion: 26.6.76



Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

GLIEDERUNG

1. Einleitung
 - 1.1 Actinomycin D
 - 1.2 Cyclophosphamid
2. Material und Methoden
3. Ergebnisse
 - 3.1 Wirkung von Cyclophosphamid
 - 3.2 Wirkung von Actinomycin D
 - 3.3 Wirkung der Kombination beider Substanzen
4. Diskussion
 - 4.1 Embryopathie - Fetopathie
 - 4.2 Reduzierte Skelettmaße unter der Behandlung
 - 4.3 Zunahme von Skelettmaßen unter der Behandlung
5. Zusammenfassung
6. Literatur
7. Bildanhang
Lebenslauf

1. Einleitung

Cytostatica finden ihren Einsatz in der Humanmedizin zur Behandlung maligner Tumoren sowie zur Immunsuppression. Derartige Therapie-Notfälle sind auch bei Frauen im konzeptionsfähigen Alter gegeben - hier sind bei Unkenntnis einer Frühschwangerschaft Interferenzen mit der Entwicklung der Frucht möglich. Wahrscheinlich durch Cyclophosphamid entstandene Mißbildungen beim Menschen werden z.B. von GREENBERG et al. (1964) an Einzelfällen berichtet.

Cytostatica sind andererseits als chemisch-definierte Substanzen guter Handhabbarkeit ein excellentes experimentelles Mittel zur Durchführung teratologischer Modellversuche und ein Hilfsmittel zur Analyse embryologischer Prozesse. Der Begriff "Cytostaticum" umschließt jedoch als pharmakologischer Wirkungsbegriff Substanzen unterschiedlicher Chemie und Wirkungsweise. NEUBERT (1968) zitiert eine Gliederung, die sich der Wirkungsmechanismen bedient. Nach dieser Gliederung werden die Cytostatica unterteilt in:

1. DNS-komplexierende Substanzen
2. alkylierende Substanzen
3. Antimetaboliten (Purin-, Pyrimidin- und Folsäure-Antagonisten)
4. Mitosehemmstoffe
5. andere Substanzen mit cytostatischer Wirkung wie
L-Asparaginase, Natulan etc.

Die in dieser Untersuchung zur Anwendung gelangten Substanzen Actinomycin D (im Folgenden ACT genannt)

und Cyclophosphamid (im Folgenden CYCLO genannt) gehören in die beiden ersten Gruppen dieser Einteilung. Ihre Wirkungsweise sowie die mit ihnen vorliegenden Erfahrungen und Ergebnisse an Embryonen werden weiter unten besprochen.

KLOPPENBURG (1972) hatte am gleichen Material Mißbildungsanalysen durchgeführt und dabei geringe synergistische oder auch antagonistische Wirkungen bei CYCLO und ACT gefunden.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war, in Ergänzung der Untersuchungen von KLOPPENBURG (1972), die morphometrische Skelettanalyse von Rattenembryonen nach einmaliger Verabfolgung von niedrigen Dosen ACT bzw. CYCLO allein oder in Kombination am Tag 12 der intrauterinen Entwicklung. Die Probleme dieser Spätabplikation, besonders im Hinblick auf die Resultate von KÖHLER und MERKER (1972), werden bei der Diskussion der Ergebnisse besprochen.

1.1 Actinomycin D

ACT ist ein tumorwirksames Antibioticum, das praktisch nur in der experimentellen Krebsforschung sowie in allen Experimenten zur Hemmung von Zellproliferationen Verwendung findet. Der Angriffspunkt von ACT als DNS-angreifende Substanz ist sehr gut bekannt. Nach detaillierten chemischen Analysen von MÖLLER und CROTHERS (1968) sowie von JAIN und SOBELL (1972) und

SOBELL und JAIN (1972) lagert sich das plane ACT-Molekül zwischen die beiden Stränge der DNS-Helix und komplexiert über spezifische H-Brücken mit den Desoxyguanosin-Teilen der DNS. Parallel dazu wird eine Veränderung der Helix-Struktur induziert.

Als direkte Folge dieser Interferenz zwischen ACT und DNS messen z.B. PREMPREE und MERZ (1968) eine Hemmung des Chromosomenrepairs strahleninduzierter Schäden unter ACT-Einfluß. In den allein mit ACT behandelten Zellen bzw. Organismen finden sich folgende Veränderungen:

- 1.) Hemmung der RNS-Synthese an der DNS (Transkription), wobei vor allem kurzlebige RNS (SAWICKY und GODMAN 1971, WIESNER et al. 1963) vermindert gebildet wird, oder speziell die Vorläufer der ribosomalen RNS gehemmt werden sollen (PERRY 1963, REVEL et al. 1964, DAVID 1969, KAY und COOPER 1969), oder ein verstärkter RNS-Abbau (SCHOLTISSEK 1970), ein Transkriptionsblock bzw. Hemmung der DNS-abhängigen RNS-Polymerase (KANN jr. und KOHN 1972, GOLDBERG und REICH 1964) diskutiert werden.
- 2.) Systematische Folgewirkungen unbekannter Art stellen Befunde dar, nach denen, oft mit höheren ACT-Dosen, biologische Oxydation und Glycolyse (LAZLO et al. 1966) gehemmt werden, dosis-abhängig eine Induktion der sauren Phosphatase in leukämischen Zellen (KAPP und OKADA 1972) nur in der späten S-Phase auftritt, wobei bei niedriger Dosierung eine Hemmung des Enzyms gemessen wird,

oder vermutlich über Gonadotropin-Dysregulationen die abortiven bzw. embryoletalen Effekte von ACT an Ratten (CARPENT und DESCLIN 1967) erklärt werden können.

Direkte teratologische Untersuchungen mit ACT liegen in einer Vielzahl von Untersuchungen vor. GRUNZ (1973) findet am Amphibienektoderm in vitro eine verzögerte Differenzierung in Epithelzellen unter ACT .

In Untersuchungen an explantierten Hühnerembryonen (KLEIN und PIERRO 1963) sowie in ovo (PIERRO 1961, WOLKOWSKI 1970) werden bevorzugte Läsionen des hinteren Rumpfabschnittes in Beziehung zum oben diskutierten Angriffspunkt der Substanz an der DNS-abhängigen RNS-Synthese festgestellt. ELIS und DIPAOLO (1970) zeigen am syrischen Hamster dosisabhängig zunächst teratogene Wirkungen, im höheren Bereich jedoch zunehmende Embryoletalität, wobei nur die teratogenen Wirkungen durch gleichzeitige Gabe von DNS (weniger von RNS), die embryoletalen Wirkungen jedoch durch gleichzeitige Gaben von Progesteron und Östron abgeschwächt werden können. SKALKO und MORSE (1969) erzielten teratogene Wirkungen von ACT an frühen Mäuseembryonen. Wird ACT Rattenembryonen in der Organogenese appliziert, so werden bevorzugt kraniale Skelettläsionen beobachtet (POZHIDAYEV 1969), während die Blastogenese kaum gestört wird. In Obereinstimmung mit JORDAN und WILSON (1970) können KÖHLER und MERKER (1972) eine Penetration von markiertem ACT in embryonale Gewebe feststellen, wobei jedoch der von JORDAN und

WILSON aus der DNS-Bindung des ACT abgeleitete Wirkungsmechanismus in den embryonalen Geweben wegen der dort zu einer wirksamen (50%igen) Hemmung der RNS-Polymerase weitaus zu niedrigen Konzentrationen von KÜHLER und MERKER (1972) abgelehnt wird. Letztere Autoren sehen Schädigungen der frühembryonalen Ernährung (Dezidua, Trophoblast) als primären Angriffspunkt der teratogenen Wirkung des ACT an.

1.2 CYCLOPHOSPHAMID

CYCLO (N,N-bis(2-chloräthyl)-propylenphosphorsäure-esterdiamid) zählt zur Gruppe der alkylierenden Substanzen und ist ein häufig verwendetes Cytostaticum in der Tumorthherapie. Die Substanz wird, bevorzugt in der Leber, durch sogenannte "mixed function oxydases" aktiviert (BROCK und HOHORST 1967) und kann dann als aktive Form in stark proliferierenden Geweben durch Alkylierung Basen- und damit Genkodeveränderungen induzieren. Genaue Einblicke in den Wirkungsmechanismus dieser ganzen Substanzgruppe fehlen trotz intensiver Forschung bis heute. KÜHLER und MERKER (1973) haben bei Applikation von 10 mg CYCLO/kg Körpergewicht an Ratten am Tag 13 post conceptionem in bestimmten Embryonalabschnitten eindeutige Veränderungen der DNS-abhängigen RNS-Polymerasen in isolierten Zellkernen beschrieben, die vor dem Auftreten umschriebener Mißbildungen auftraten. Teratogene Wirkungen von CYCLO sind in vielen Untersuchungen beschrieben worden, an Mäusen z.B. von GIBSON und BECKER (1968) sowie von GEBHARDT (1970), an

Ratten wurden teratogene Wirkungen in der Organogenese von VON KREYBIG und SCHMIDT (1967) sowie HACKENBERGER und VON KREYBIG (1965) beschrieben. Über in Einzelfällen beim Menschen auf CYCLO zurückzuführende Mißbildungen berichten GREENBERG et al. (1964) sowie KNÜRR et al. (1969).

ACT und CYCLO unterscheiden sich in ihrem Wirkungsmechanismus auf den genetischen Informationsfluß. Nach speziell auf die Teratologie ausgerichteten pharmakodynamischen Analysen von pharmakokinetischen Daten (Dosis-Wirkungskurven) durch JUSKO (1972) zählen beide Substanzen weiter zu unterschiedlichen Klassen teratogener Substanzen. CYCLO zählt danach wie Thalidomid, 6-Aminonikotinsäureamid und N-Lost zu Agentien ohne erkennbare minimale Schwellendosis. Bei den teratogenen Substanzen zweiter Klasse, zu denen neben Aspirin, 5-Fluoruracil, Diphenylhydantoin, Morphin, Borsäure, Reserpin und Hydroxyharnstoff auch ACT (extrapolierte Minimaldosis bei der Ratte 0.18 mg/kg nach WILSON 1965) zählt, tritt eine teratogene Wirkung erst oberhalb einer Schwellendosis auf. Eine Kombination derartiger Substanzen von unterschiedlichen biochemischen Wirkungsmechanismen in der frühen fetalen Rattenentwicklung, in der keine drastischen Mißbildungen mehr zu erwarten sind, sowie eine morphometrische Analyse der Skelettelemente sind daher von besonderem wissenschaftlichem Interesse.

2. MATERIAL UND METHODEN

Substanzen: CYCLO wurde als ENDOXAN^R-ASTA verwendet. Die Lösungen wurden aus den Trockenampullen (200 mg) durch Auflösen in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Die entsprechenden Dosierungen wurden am Tag 12 p.c. intraperitoneal injiziert. ACT wurde als Präparat der Fa. MERCK, SHARP & DOHME verwendet. Die entsprechenden Dosen in physiologischer NaCl-Lsg. wurden am Tag 12 p.c. subcutan injiziert. Tabelle 1 gibt das Applikationsschema der verwendeten Substanzen an:

Tabelle 1: Applikationsschema

Substanz	Dosis g/kg	Dosis mg/kg	Art der Applikation	Zahl der Feten
CYCLO		4	i.p.	45
CYCLO		5	i.p.	44
CYCLO		6	i.p.	47
ACT	100		sc.	32
ACT	150		sc.	54
ACT+CYCLO	100	4	sc.+i.p.	26
ACT+CYCLO	100	6	sc.+i.p.	21

KONTROLLEN: physiolog. NaCl sc. und/oder i.p.⁴⁹

Tiermaterial. Die Versuche wurden an trächtigen Rattenweibchen des Stammes Wistar SW 69 durchgeführt. Die Behandlung mit den Einzelsubstanzen bzw. Kombinationen erfolgte nur einmal am Tag 12 nach der Konzeption. Die Haltung der Tiere erfolgte bei 23°C

Zuchtraumtemperatur und 50 bis 60% relativer Luftfeuchtigkeit unter einem verschobenen Hell-Dunkelzyklus (Lichtperiode 12 Uhr mittags bis 2 Uhr früh). Die Tiere hatten freien Zugang zu Leitungswasser und Standard-Altromin-Futter. Das Alter der Embryonen wurde aus der erfolgreichen Paarung (positiver Spermiennachweis gleich Tag 0 der Entwicklung) errechnet. Durch den verschobenen Hell-Dunkel-Zyklus ist die Bestimmung des Konzeptionszeitpunktes erleichtert. Näheres hierzu siehe KLOPPENBURG 1972.

PRÄPARATION DER FETEN.

Am Tag 21 der Gestation, kurz vor dem errechneten Geburtstermin also, wurden die Feten per Section entnommen und präpariert. Augen, Haut, subcutanes Fettgewebe sowie Eingeweide wurden entfernt. Der Restkörper wurde eine Stunde lang in Wasser gewaschen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte über Acetonbäder, mehrstündige Aufhellung in KOH-Alizarin, Einbringen in Benzylalkohol-Xthanol-Glycerin (1:2:2) und Aufbewahrung in Glycerin bis zur Messung. (Detaillierte Angaben bei ASISI, in Vorbereitung).

MORPHOMETRIE.

Die Skelettpräparate wurden nach einer Mindestaufbewahrungszeit von 2 Monaten in Glycerin ausgemessen, um Quellungs- oder Schrumpfungsvorgänge zum Abschluß kommen zu lassen. Die Messung erfolgte mit einem Stereo-

Mikroskop der Fa. Zeiss unter Verwendung eines Meßokulars. Die im Verlaufe der Messungen mehrfach überprüfte Justierung erfolgte durch exakte Einstellung von 100 Teilstrichen des Okulars auf 10 mm (Millimeterpapier). Die direkte Meßgenauigkeit liegt somit bei 1/10 mm. Die gemessenen Ossifikationspunkte sowie Skelettelementlängen sind aus den Tabellen der Meßwerte 2 bis 4 ersichtlich. Die gemessenen Distanzen an den Schädelknochen sind auf Photos im Bildanhang dargestellt. Zur Meßgenauigkeit: In der Arbeit von ASISI sowie in der vorliegenden Arbeit wurden gleiche Tiere unabhängig voneinander untersucht. Leider lassen sich direkt nur die Messungen an den Röhrenknochen vergleichen. Eine Gegenüberstellung der gemittelten Rechts-/Links-Werte für Humerus, Ulna, Femur, Tibia und Fibula ergaben nur minimale Abweichungen innerhalb des Bereichs der normalen Standardabweichungen.

STATISTIK.

Unter Annahme einer Normalverteilung der Meßwerte wurden die Einzelwerte in einen Programmrechner der Fa. WANG eingegeben und das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und die Signifikanz (PATAU-Darstellung) bestimmt. Signifikanz wurde bei P-Werten < 0.01 , starke Signifikanz bei P-Werten < 0.001 angenommen.

3. ERGEBNISSE.

Die Meßergebnisse sind in den Tabellen 2 bis 4 angegeben, wobei die von den Kontrollen signifikanten Abweichungen markiert sind. In den Diagrammen 1 bis 7 sind die prozentualen Abweichungen der Längenmessungen der behandelten Tiere von den Werten der Kontrolltiere (Behandlung mit physiologischer Kochsalzlösung) dargestellt. Aus den Diagrammen folgt, daß Recht-Links-Unterschiede in dieser Untersuchung nicht auftraten bzw. so gering sind, daß sie in der physiologischen Norm liegen.

LEGENDE ZU DEN TABELLEN 2-4.

"Schädellänge" und "Schädelhöhe" siehe Skizze im Fotoanhang. Die Angabe erfolgt in mm. Ebenso in mm werden folgende Parameter angegeben: Os Intraparietale, Ulna, Radius, Humerus, Femur, Tibia, Fibula. Bei den restlichen Parametern (Sternum, Rippen, Metacarpales und Metatarsales, Halswirbel, "Dorsale" und "Lumbale" sowie "Restliche" Wirbel) wurde die Anzahl der vorhandenen Ossifikationspunkte angegeben.

Unter "Restliche Wirbel" wird die Summe von Sacral- und Schwanzwirbeln angegeben.

Die Signifikanz P wurde nur im Falle $P < 0.01$ angegeben.

TABELLE 2: Kontrollwerte n=49

	Mittelwert(mm)	s
Schädellänge	11.07	0.42
Schädelhöhe	5.12	0.31
Os intraparietale,Länge	1.76	0.21
Os intraparietale,Breite	4.66	0.72
Sternum,Ossifikationspkte.	5.22	0.74
Rippen	13.02	0.39
Metacarpales rechts	3.00	0.20
Metacarpales links	3.00	0.20
Metatarsales rechts	3.97	0.14
Metatarsales links	3.97	0.14
Halswirbel	6.90	0.27
Dorsale Wirbel	13.00	0.39
Lumbale Wirbel	6.00	0.39
Restliche Wirbel	7.31	0.63
Ulna rechts	2.76	0.20
Ulna links	2.69	0.22
Humerus rechts	2.61	0.18
Humerus links	2.59	0.15
Radius rechts	2.08	0.13
Radius links	2.07	0.16
Femur rechts	1.84	0.24
Femur links	1.86	0.17
Tibia rechts	2.16	0.19
Tibia links	2.17	0.17
Fibula rechts	2.06	0.23
Fibula links	2.08	0.12

TABELLE 2 A (4mg/kg CYCLO) n=45

	Mittelwert(mm)	s	p
Schädellänge	11.07	1.49	-
Schädelhöhe	4.81	0.33	-
Os intraparietale,Länge	1.76	0.23	-
Os intraparietale,Breite	4.87	0.61	-
Sternum,Ossifikationspkte.	4.00	0.29	-
Rippen	13.00	0.00	-
Metacarpales rechts	3.00	0.00	-
Metacarpales links	3.00	0.00	-
Metatarsales rechts	3.93	0.28	-
Metatarsales links	3.93	0.27	-
Halswirbel	7.00	0.00	-
Dorsale Wirbel	13.00	0.00	-
Lumbale Wirbel	6.00	0.00	-
Restliche Wirbel	6.24	0.43	-
Ulna rechts	2.65	0.29	-
Ulna links	2.55	0.28	-
Humerus rechts	2.51	0.23	-
Humerus links	2.48	0.24	-
Radius rechts	1.98	0.21	-
Radius links	1.96	0.21	-
Femur rechts	1.75	0.23	-
Femur links	1.72	0.24	-
Tibia rechts	1.98	0.24	-
Tibia links	1.97	0.23	-
Fibula rechts	1.97	0.22	-
Fibula links	1.97	0.21	-

TABELLE 2 B (5mg/kg CYCLO) n=44

	Mittelwert(mm)	s	p
Schädellänge	11.31	0.41	-
Schädelhöhe	5.06	0.39	-
Os intraparietale,Länge	1.87	0.17	-
Os intraparietale,Breite	4.97	0.47	-
Sternum,Ossifikationspkte.	5.38	0.37	-
Rippen	13.00	0.00	-
Metacarpales rechts	3.01	0.01	-
Metacarpales links	3.01	0.01	-
Metatarsales rechts	4.00	0.00	-
Metatarsales links	4.00	0.00	-
Halswirbel	7.00	0.00	-
Dorsale Wirbel	13.00	0.00	-
Lumbale Wirbel	6.00	0.00	-
Restliche Wirbel	7.52	0.66	-
Ulna rechts	2.84	0.17	<0.01
Ulna links	2.78	0.13	<0.01
Humerus rechts	2.72	0.12	<0.01
Humerus links	2.70	0.10	<0.01
Radius rechts	2.13	0.09	<0.01
Radius links	2.05	0.08	<0.01
Femur rechts	1.89	0.10	<0.01
Femur links	1.87	0.11	<0.01
Tibia rechts	2.23	0.13	<0.01
Tibia links	2.19	0.14	<0.01
Fibula rechts	2.14	0.11	<0.01
Fibula links	2.14	0.11	<0.01

TABELLE 2 C (6mg/kg CYCLO) n=47

	Mittelwert(mm)	s	p
Schädellänge	10.76	0.46	-
Schädelhöhe	4.67	0.39	-
Os intraparietale,Länge	1.57	0.25	-
Os intraparietale,Breite	3.96	1.15	-
Sternum,Ossifikationspkte.	3.34	1.40	-
Rippen	13.04	0.20	-
Metacarpales rechts	3.00	0.00	-
Metacarpales links	2.97	0.15	-
Metatarsales rechts	3.95	0.29	-
Metatarsales links	3.89	0.31	-
Halswirbel	7.00	0.00	-
Dorsale Wirbel	13.02	0.25	-
Lumbale Wirbel	5.96	0.20	-
Restliche Wirbel	5.89	1.09	-
Ulna rechts	2.56	0.28	-
Ulna links	2.51	0.26	-
Humerus rechts	2.44	0.20	-
Humerus links	2.46	0.23	-
Radius rechts	1.92	0.19	-
Radius links	1.90	0.21	-
Femur rechts	1.65	0.17	-
Femur links	1.65	0.17	-
Tibia rechts	1.89	0.22	-
Tibia links	1.82	0.31	-
Fibula rechts	1.83	0.34	-
Fibula links	1.86	0.19	-

TABELLE 3 A (100 g/kg ACT) n=32

	Mittelwert(mm)	s	p
Schädellänge	12.04	0.46	-
Schädelhöhe	5.56	0.47	-
Os intraparietale,Länge	1.72	0.20	-
Os intraparietale,Breite	4.99	0.42	-
Sternum,Ossifikationspkte.	5.34	0.65	-
Rippen	13.00	0.00	-
Metacarpales rechts	3.00	0.00	-
Metacarpales links	3.00	0.00	-
Metatarsales rechts	3.81	0.78	-
Metatarsales links	4.00	0.00	-
Halswirbel	7.00	0.00	-
Dorsale Wirbel	13.00	0.00	-
Lumbale Wirbel	6.00	0.00	-
Restliche Wirbel	6.59	0.67	-
Ulna rechts	2.73	0.25	-
Ulna links	2.75	0.24	-
Humerus rechts	2.58	0.21	-
Humerus links	2.58	0.21	-
Radius rechts	2.10	0.18	-
Radius links	2.08	0.18	-
Femur rechts	1.86	0.16	-
Femur links	1.88	0.16	-
Tibia rechts	2.21	0.16	-
Tibia links	2.20	0.15	-
Fibula rechts	2.10	0.17	-
Fibula links	2.10	0.18	-

TABELLE 3 B (150 g/kg ACT) n=32

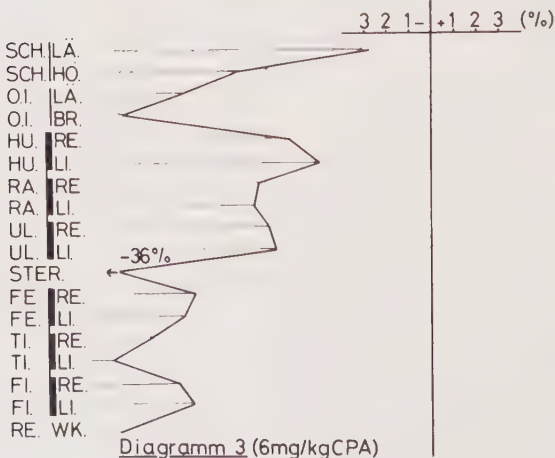
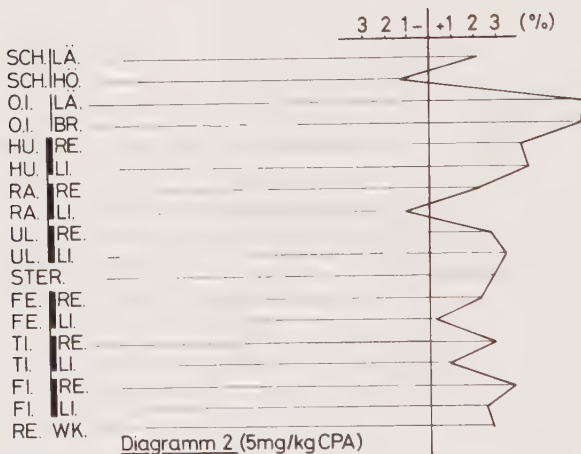
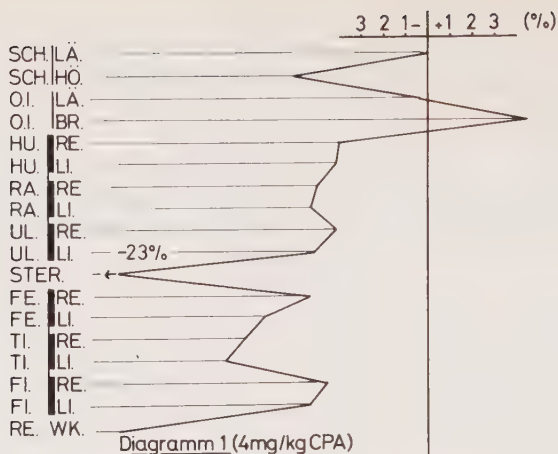
	Mittelwert(mm)	s	p
Schädellänge	11.52	1.53	-
Schädelhöhe	5.65	0.27	-
Os intraparietale,Länge	1.70	0.21	-
Os intraparietale,Breite	4.97	0.25	-
Sternum,Ossifikationpkts	5.29	0.82	-
Rippen	13.00	0.00	-
Metacarpales rechts	3.01	0.14	-
Metacarpales links	3.01	0.14	-
Metatarsales rechts	4.00	0.00	-
Metatarsales links	4.00	0.00	-
Halswirbel	7.00	0.00	-
Dorsale Wirbel	13.00	0.00	-
Lumbale Wirbel	6.00	0.00	-
Restliche Wirbel	6.79	0.63	-
Ulna rechts	2.66	0.22	-
Ulna links	2.64	0.23	-
Humerus rechts	2.54	0.14	-
Humerus links	2.50	0.15	-
Radius rechts	2.02	0.16	-
Radius links	1.99	0.25	-
Femur rechts	1.74	0.14	<0.01
Femur links	1.71	0.14	<0.01
Tibia rechts	2.03	0.14	-
Tibia links	2.07	0.19	-
Fibula rechts	2.00	0.12	<0.01
Fibula links	2.00	0.15	<0.01

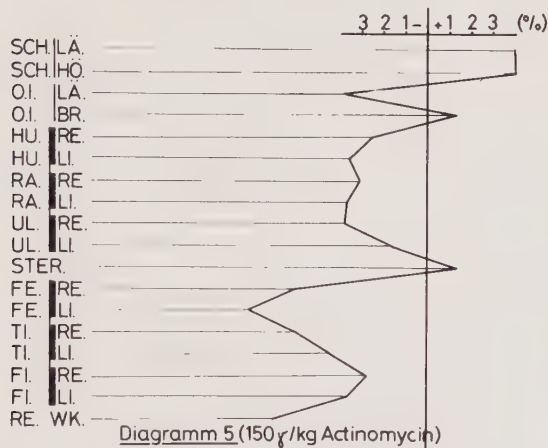
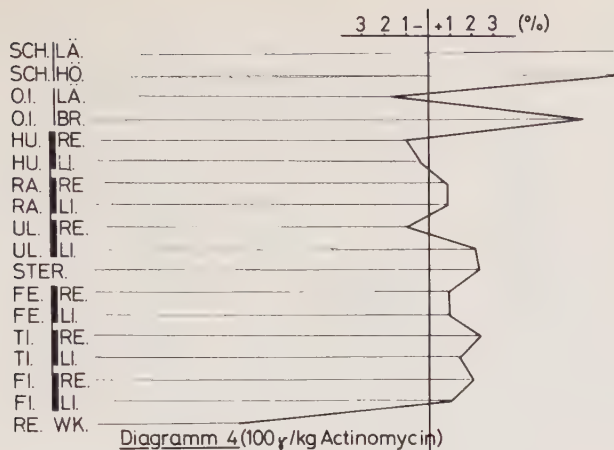
TABELLE 4 A (100 γ /kg ACT + 4mg/kg CYCLO) n=26

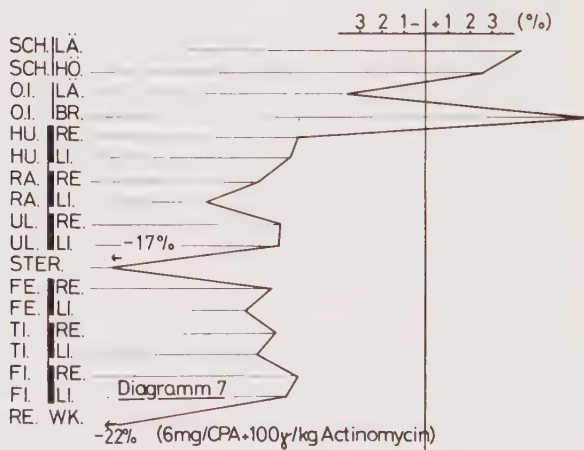
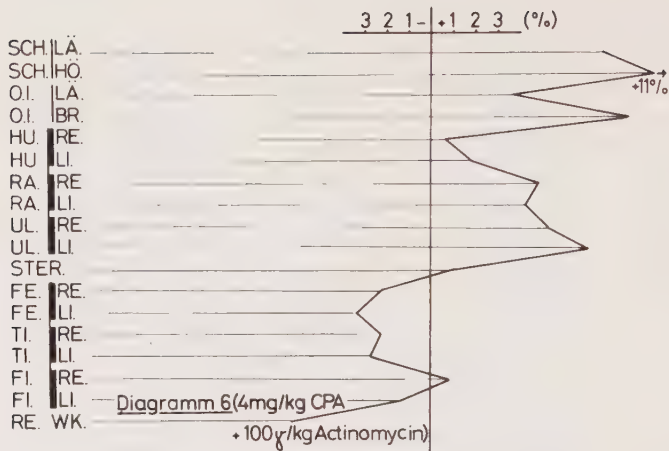
	Mittelwert(mm)	s	p
Schädellänge	11.92	0.23	<0.001
Schädelhöhe	5.70	0.29	<0.001
Os intraparietale,Länge	1.81	0.18	-
Os intraparietale,Höhe	5.08	0.22	<0.01
Sternum,Ossifikationspkte.	5.27	0.60	-
Rippen	13.00	0.00	-
Metacarpales rechts	3.00	0.00	-
Metacarpales links	3.00	0.00	-
Metatarsales rechts	3.85	0.78	-
Metatarsales links	4.00	0.00	-
Halswirbel	7.00	0.00	-
Dorsale Wirbel	13.00	0.00	-
Lumbale Wirbel	6.00	0.00	-
Restliche Wirbel	6.85	0.46	-
Ulna rechts	2.91	0.17	-
Ulna links	2.88	0.17	-
Humerus rechts	2.62	0.47	-
Humerus links	2.63	0.41	-
Radius rechts	2.18	0.15	<0.01
Radius links	2.15	0.14	<0.001
Femur rechts	1.80	0.12	-
Femur links	1.80	0.12	<0.01
Tibia rechts	2.11	0.13	-
Tibia links	2.11	0.12	<0.01
Fibula rechts	2.08	0.12	-
Fibula links	2.05	0.11	-

TABELLE 4 B (100 γ /kg ACT + 6mg/kg CYCLO) n=21

	Mittelwert(mm)	s	p
Schädellänge	11.52	0.51	<0.001
Schädelhöhe	5.25	0.38	-
Os intraparietale,Länge	1.70	0.21	-
Os intraparietale,Breite	5.00	0.31	-
Sternum,Ossifikationspkte.	4.33	1.28	<0.001
Rippen	13.00	0.00	-
Metacarpales rechts	2.95	0.22	-
Metacarpales links	2.95	0.22	-
Metatarsales rechts	3.81	0.40	-
Metatarsales links	3.85	0.36	-
Halswirbel	7.00	0.00	-
Dorsale Wirbel	13.00	0.00	-
Lumbale Wirbel	6.00	0.00	-
Restliche Wirbel	5.71	1.10	<0.001
Ulna rechts	2.58	0.36	<0.01
Ulna links	2.51	0.36	-
Humerus rechts	2.46	0.29	-
Humerus links	2.43	0.27	-
Radius rechts	1.91	0.25	<0.001
Radius links	1.86	0.25	<0.001
Femur rechts	1.71	0.18	<0.001
Femur links	1.70	0.17	<0.001
Tibia rechts	2.01	0.22	<0.001
Tibia links	2.00	0.21	<0.001
Fibula rechts	1.94	0.21	<0.001
Fibula links	1.95	0.20	<0.001







Nach der Einteilung der Teratogene durch JUSKO (1972) ist CYCLO eine Substanz 1. Klasse ohne subteratogenen Dosis-Bereich. Auch in der ausklingenden Phase der Organogenese und beim Beginn der fetalen Wachstumsphase sollten bei Anwendung einer genügend feinen Methodik schädigende Wirkungen auch niedriger Dosierungen von CYCLO feststellbar sein.

Die veränderten Skelettmaße sind in den Tabellen 2A, 2B und 2C sowie ihre prozentualen Abweichungen von den Mittelwerten der Kontrollföten in den Diagrammen 1 - 3 wiedergegeben. Hiernach wird durch einmalige Applikation von 4 mg/kg CYCLO am 12. intrauterinen Entwicklungstag eine gleichförmige, wenn auch nur geringgradige Retardierung des fetalen Skeletts bewirkt, die in diesem Experiment statistisch signifikant durch unvollständige Ossifikationen des Sternums und der kaudalen und sakralen Wirbelkörper erscheint. Das Os intraparietale wirkt gegenüber den Kontrollen sogar leicht vergrößert. Applikation von 6 mg/kg CYCLO am 12. intrauterinen Entwicklungstag scheint die generelle geringgradige Retardierung des fetalen Skeletts gegenüber den Wirkungen von 4 mg/kg CYCLO zu verstärken, hier erscheint auch das Os intraparietale mitbetroffen. Überraschenderweise ergibt sich nach Applikation von 5 mg/kg CYCLO am gleichen Entwicklungstag ein ganz anderes Bild: die meisten Skelettmaße erscheinen jetzt im Vergleich zu den Kontrollwerten (vgl. Diagramm 2) gleichmäßig geringfügig vergrößert.

Diese Effekte kommen auch dann noch zum Ausdruck, wenn man die Mittelwerte aller prozentualen Abweichungen bildet (trotz einer möglichen Kompensierung positiver und negativer Werte). Dann betragen die mittleren prozentualen Abweichungen im Vergleich zu den Kontrollmittelwerten (gleich 100 %):

- 4.28 % nach 4 mg/kg CYCLO:

+ 2,15 % nach 5 mg/kg CYCLO;

- 7,37 % nach 6 mg/kg CYCLO.

Diese Betrachtung des Skelettmusters scheint für eine Dosisabhängigkeit zwischen 4 und 6 mg/kg CYCLO bei einmaliger Applikation zu sprechen, wobei nach 5 mg/kg CYCLO sogar eine gegenläufige Reaktion der Skelettelemente auftritt. Werden jedoch die Zahlen für einige Skelettelemente ohne prozentuale Umrechnung (Abbildung 1) als Mittelwerte mit Standardabweichung aufgetragen, verlieren diese geringen prozentualen Differenzen angesichts der durch die kleinen Tierzahlen großen Standardabweichungen an Wert. Dies gilt für alle Versuchsgruppen dieses Experiments. Andererseits verlangen jedoch die in den Darstellungen der Muster (Diagramme 1 - 7) nach einer Interpretation.

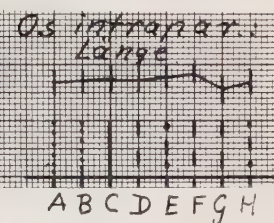
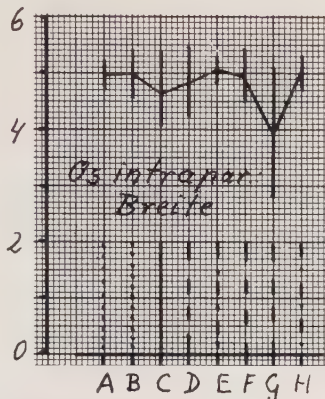
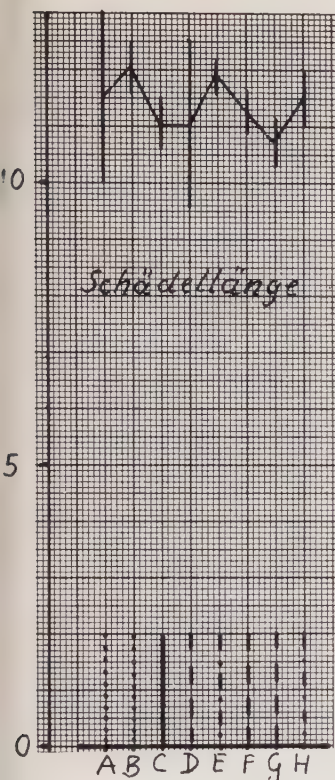
3.2 Wirkung von Actinomycin D

JUSKO (1972) hält nach Zahlenangaben bei WILSON (1965) das Actinomycin D für eine teratogene Substanz 2. Klasse mit einer teratogenen Schwellendosis von ca. 180 μ /kg. Die hier verwendeten Dosierungen von 100 bzw. 150 μ /kg liegen also unter diesem Bereich. Nach den Tabellen 3A und 3B weicht kein Mittelwert der Versuchsgruppen vom Mittelwert der Kontrollgruppe mit einer Signifikanz $P < 0,01$ ab. Nach 100 μ /kg ACT sind im Diagramm 4 bis auf die Ossifikation der Sacrales und Caudales praktisch identisch mit Werten der Kontrollgruppe (mittlere prozentuale Abweichung + 0,83 %). Nach 150 μ /kg ACT scheint im Diagramm 5 (mit Ausnahme von Schädelhöhe und Schädellänge) eine geringfügige Reduktion aller Skelettparameter einzusetzen (mittlere prozentuale Abweichung von - 1,38 %).

3.3 Wirkung der Kombination beider Substanzen

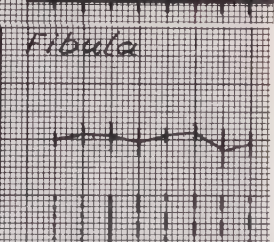
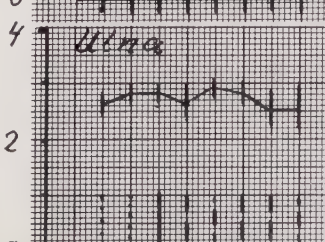
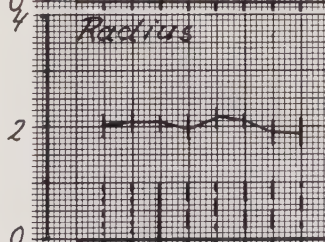
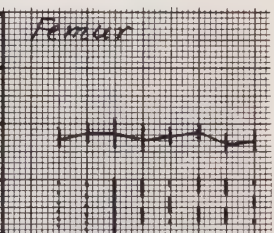
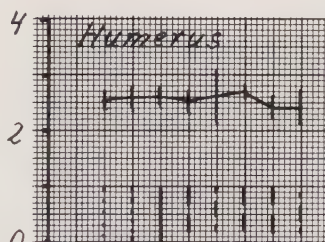
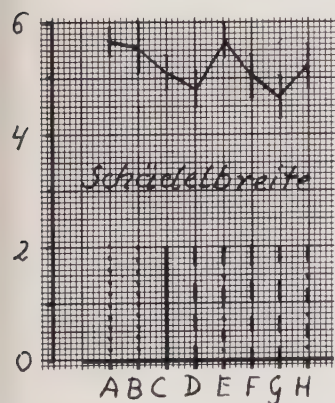
Die Meßergebnisse der Kombination von 100 μ /kg ACT mit 4 bzw. 6 mg CYCLO/kg sind in den Tabellen 4A und 4B sowie den Diagrammen

Abbildung 1: Skelettlängen (in mm; Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung).



Versuchsgruppen:

A - 150r/kg ACT	E - 4 mg CYCLO + 100r/kg ACT
B - 100r/kg ACT	F - 5 mg CYCLO/kg
C - Kontrollen	G - 6 mg CYCLO/kg
D - 4 mg CYCLO/kg	H - 6 mg CYCLO + 100r/kg ACT



A B C D E F G H

A B C D E F G H

6 und 7 dargestellt. Durch Erhöhung der CYCLO-Dosis werden anscheinend auch hier die Skelettparameter reduziert. Hierbei wirken Maße am vorderen Körperabschnitt (Schädel und obere Extremität) im Vergleich mit den Kontrollen leicht vergrößert, Maße des unteren Körperabschnittes dagegen reduziert. Diese unterschiedliche Reaktion der Körperabschnitte bleibt auch in der Kombination mit 6 mg/kg CYCLO erhalten, trotz der hier insgesamt stärkeren Reduktion der Skelettparameter (mittlere prozentuale Abweichung - 4,78 %, in der Kombination aus 100 μ /kg ACT + 4 mg/kg CYCLO + 1,61%). Das Reaktionsmuster der Kombinationen ähnelt insgesamt mehr dem Reaktionsmuster nach einfacher Applikation von Cyclophosphamid.

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE.

4.1 EMBRYOPATHIE-FETOPATHIE.

Teratogene Effekte können nur bei phasengerechter Applikation einer teratogen wirksamen Substanz resultieren. Unabhängig davon, ob ACT direkt im Embryo angreift, wie dies JORDAN und WILSON (1970) vermuten, oder ob die Schädigung primär an mütterlichen Nährgeweben vor intakter Plazentation (etwa ab Tag 10 der intrauterinen Rattenentwicklung) erfolgt (KÜHLER und MERKER, 1972), können bei exact bestimmbarem Gestationsalter durch Applikation am 12. intrauterinen Entwicklungstag keine Mißbildungen wie Aplasien u.ä. mehr erzeugt werden. Wegen der unterschiedlichen Terminierung des Konzeptionsalters ist ein direkter Vergleich mit Daten der Literatur oft

problematisch. Die Plazentagängigkeit von markiertem ACT ist sowohl von JORDAN und WILSON (1970) wie auch von KÖHLER und MERKER (1972) bestätigt worden und auch aus den eingangs erwähnten Arbeiten von CYCLO bekannt. Teratogene Schäden in der Organogenese lassen sich allgemein auf die Hemmung von Proliferationen oder die Verstärkung von Einschmelzungen zurückführen.

Morphogenetische Prozesse kleineren Umfangs in Form von regional verstärktem oder vermindertem Wachstum oder lokaler Nekroseherde (vgl. Neubert et al. 1970) sind auch für die fetale Phase der intrauterinen Entwicklung anzunehmen. Besonders bei nur einmal applizierten Substanzen muß angenommen werden, daß eine intrauterine Defektheilung und Regeneration stattfindet, deren Ausmaß unbekannt ist. Die in dieser Untersuchung vorliegenden Meßdaten, 10 Tage nach einmaliger Applikation gewonnen, stellen daher nur die Summe aller möglichen Effekte in ihren Auswirkungen auf das fetale Skelett dar. Ein Rückschluß auf die Art der Schädigung ist aus den erhaltenen Meßwerten nicht möglich. Bei Verwendung höherer Dosierungen von CYCLO (20 bzw 40 mg/kg) am 15. und 16. Tag der Trächtigkeit (Zählung ab positivem Spermiennachweis im Vaginalabstrich) und unter Einsatz histologischer Techniken haben VON KREYBIG und SCHMIDT (1967) im Gehirn und mesenchymalem Gewebe regionale Nekrosen sowie nachfolgend Reparationsprozesse beobachtet. SCHMIDT (1967) beschreibt mit 20 mg/kg CYCLO bei Ratten am 13. Trächtigkeitstag gleichfalls degenerative Veränderungen

in Zellkernen und Zonen von Zelluntergängen, wobei diese Phänomene auch in unbehandelten Embryonen auftreten, nach CYCLO jedoch stark erhöht. In Versuchen von SINGH und SANYAL (1974) wurden mit Dosierungen zwischen 8 und 20 mg/kg CYCLO an Wistarratten nach Applikation an den Tagen 12, 13 oder 14 und unterschiedlichem Inspektionsintervall der Sectio in hohem Maße gestörte Ossifikation der Hinde beschrieben, jedoch auch Anzeichen für eine sehr intensive Regeneration (intrauterin) gefunden.

Anscheinend können alkylierende Pharmaka sowohl wachsende wie sich differenzierende Anteile des fetalen Organismus schädigen.

Die sehr geringen morphometrisch faßbaren Skelettabweichungen mit den hier angewandten sehr niedrigen ACT-Dosierungen könnten auch das Resultat eines extra-embryonalen Effektes sein, da nach KÜHLER und MERKER (1972) ACT in Dosen unter 1 mg/kg bei Rattenembryonen zu keiner meßbaren Hemmung der RNS-Polymerase in isolierten Zellkernen führt.

4.2 REDUZIERTER SKELETTMASSE.

Eine Dosis-Wirkungsbeziehung besteht bezüglich der Zunahme reduzierter Skelettmaße zwischen 4 und 6 mg/kg CYCLO. Nach Werten von ASISI (in Vorbereitung) tritt diese Reduktion weiter verstärkt bei Anwendung von 10 mg/kg CYCLO auf. Zunehmende Reduktion (von übernormal hohen Ausgangswerten) tritt auch beim Vergleich von 100 und 150 μ /kg ACT sowie bei der Kombination von 100 μ /kg ACT mit 4 bzw. 6 mg/Kg CYCLO auf.

Derartige Effekte können durch eine Verstärkung regionaltypischer Nekrosen erklärt werden, aber auch durch Einflüsse auf den mütterlichen Organismus, da bei einer Vielzahl von Schädigungen auch durch nicht-teratogene Faktoren Kümmerformen bei den Feten auftreten. Die eindeutigsten Effekte wurden mit 6 mg/kg CYCLO erzielt, wobei die stärksten Hemmungen an den Hinterextremitäten auftraten. Die Vorderextremität ist weniger geschädigt.

Das Schädigungsmuster der geringen ACT-Dosen ist gleichförmiger, das Reaktionsmuster der Kombinationen ähnelt mehr den Wirkungen des in ihnen enthaltenen CYCLO. Erwähnt werden muß die unter 4 und 6 mg/kg CYCLO ausgeprägte Ossifikationsstörung des Sternums, die auch bei Kombination von 6 mg/kg CYCLO mit 100 γ /kg ACT erscheint, an diesem Tiermaterial in der Kombination mit 4 mg/kg CYCLO + 100 γ /kg ACT fehlt.

4.3 Zunahme von Skelettmaßen

In den Versuchsgruppen mit 5 mg/kg CYCLO bzw. mit 100 γ /kg ACT + 4 mg/kg CYCLO treten insgesamt sowie für einige Skelettparameter ausgeprägter (z.T. mit Werten von + 10 % im Vergleich mit den Kontrollmittelwerten) Größenzunahmen für Skelettmaße bzw. Ossifikationen auf. Diese Erscheinungen brechen die Dosisabhängigkeit der in den Mustern der Diagramme dargestellten Effekte. Aus den vorliegenden geringen Tierzahlen kann zudem nicht auf eine Nicht-Zufälligkeit dieser geringen Größenzunahmen geschlossen werden. Auch ihre Interpretation ist schwierig. Nach MERKER (pers. Mitt.) wäre folgende Hypothese denkbar: In verschiedenen Phasen der Ausbildung der Organe treten umschriebene Nekroseherde offenbar nach einem genetisch determinierten Muster auf. Auch die eingangs bereits zitierten Beobachtungen von VON KREYBIG

und SCHMIDT und SCHMIDT (beide 1967) werden von den Autoren ähnlich interpretiert. Eine Schädigung dieser präsumptiven Nekrosebezirke, für die auch eine sensible Phase denkbar ist, könnte einmal bei geringer Expressivität eine Hinderung dieser normalen Einschmelzungen oder deren verzögertes Auftreten bewirken, zum anderen könnte eine geringgradige Verstärkung solcher Nekroseherde durch eine vermehrte lokale Bereitstellung von Nährmaterial die intrauterine Regeneration verstärken. Beide Geschehnisse würden ein verstärktes Wachstum ermöglichen. ASISI hat mit Azathioprin ähnliche Wachstumszunahmen am fetalen Rattenskelett gemessen. Da Einschmelzungen stets mit einer Aktivierung der lysosomalen Enzyme verbunden sind, erscheinen die eingangs zitierten Befunde von KAPP und OKADA (1972), die das lysosomale "marker enzyme" saure Phosphatase unter geringen Dosierungen von ACT gehemmt, unter ansteigenden Dosierungen jedoch vermehrt finden, von besonderem Interesse und lassen sich in die von MERKER entwickelten Vorstellungen einfügen.

5. ZUSAMMENFASSUNG.

Untersucht wurde die Wirkung einer einmaligen Applikation von 4, 5 und 6 mg/kg Cyclophosphamid, von 100 und 150 μ /kg Actinomycin D sowie einer Kombination von 100 μ /kg Actinomycin D mit 4 bzw. 6 mg/kg Cyclophosphamid an schwangeren Ratten vom Stamm Wistar am Tag 12 post conceptionem. Gemessen wurde man durch Sectio am 21.

Trächtigkeitstag entnommenen, mit KOH aufgehellten und mit Alizarin angefärbten Feten die Ossifikation sowie die Längen von Skelettelementen gemessen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2A bis 4B zusammengefaßt und in den Diagrammen 1 - 7 sowie in der Abbildung 1 dargestellt. Je nach Substanz und Dosierung treten typische Reaktionsmuster auf, die aus der Darstellung der mittleren prozentualen Abweichung der Versuchsmittelwerte zu den Kontrollmittelwerten in den Diagrammen resultieren. Zwischen 4 und 6 mg/kg CYCLO scheint eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu bestehen. In den Kombinationen aus CYCLO plus ACT scheint sich die Wirkung des CYCLO durchzusetzen. In den Versuchsgruppen mit 5 mg/kg CYCLO und z.T. auch nach 4 mg/kg CYCLO + 100 γ /kg ACT sind Skelettparameter im Vergleich zu den Kontrollwerten vergrößert. Diese Größenzunahmen sowie die sonst beobachteten Reduktionen werden diskutiert.

6. Literatur.

- ASISI,A. Morphometrische Analyse der Wirkungen von Cyclophosphamid und Azathioprin auf die intra-uterine Skelettentwicklung von Wistarratten. Dissertation (in Vorber.) FU Berlin
- BROCK,N. und HOHORST,H.J. (1967) Metabolism of cyclophosphamide. Cancer 26 900-904.
- CARPENT,G.,DESCLIN,L. (1967) Apropos du mecanisme d'action de l'actinomycine D sur la gestation chez le rat. C.R.Acad.Sci. Paris D 264, 2933-2936.
- DAVID,H. (1969) Morphometrische Untersuchungen membrangebundener und freier Ribosomen und Polysomen der Leber der Maus nach Actinomycinapplikation. Acta.biol.med.germ. 22, 787-795.
- ELIS,J.,DIPAULO,J.A. (1970) The alteration of actinomycin D teratogenity by hormones and nucleic acids. Teratology 3, 33-38.
- GEBHARDT,D. (1970) The embryoletal and teratogenic effects of cyclophosphamide on mouse embryos. Teratology 3, 273-277.
- GIBSON,J.F.,BECKER,B.A. The teratogenity of cyclophosphamide in mice. Cancer Res. 28, 475-480.
- GREENBERG,L.H.,VERDES,P.,TANAKA,K.R. (1964) Congenital anomalies probably induced by cyclophosphamide. J.Amer.Med.Assoc.,188, 423-426.

- GRUNZ, H. (1973) The ultrastructure of amphibian ectoderm treated with an inductor or actinomycin D. Wilhelm Roux Archiv 173, 283-293.
- HACKENBERGER, I. KREYBIG, Th. von (1965) Vergleichende teratologische Untersuchungen bei der Maus und der Ratte. Arzneimittel-Forsch. 15, 1156-1160.
- JAIN, S. C., SOBELL, H. M. Stereochemistry of actinomycin binding to DNA. Refinement and further structural details of the actinomycin-deoxyguanosine crystalline complex. J. Molec. Biol. 68, 1-20.
- JORDAN, H. L., WILSON, J. G. (1970) Radioautographic study of RNA synthesis in normal and actinomycin-d-treated embryos. Anat. Rec. 168, 549-564.
- JUSKO, W. J. (1972) Pharmacodynamic principles in chemical teratology: dose-effect relationships. J. Pharmacol. exp. Ther. 183, 469-480.
- KANN, H. E., KOHN, K. W. (1972) Effects of anthramycin and actinomycin on RNA synthesis pattern in L 1210 cells. J. Cell. Physiol. 79, 331-342.
- KAPP, J. E., OKADA, S. (1972) Actinomycin induction of the acid phosphatase in synchronised L 5178 Y mouse leukemia cells. Exp. Cell. Res. 72, 473-479.
- KAY, J. E., COOPER, H. L. (1969) Differentiation inhibition of 28S and 18S ribosomal RNA synthesis by actinomycin. Bioch. Biophys. Res. Commun. 35, 526-535.
- KLEIN, N. W., PIERRO, R. J. (1963) Actinomycin D: Specific inhibitory effects on the explanted chick embryo. Science 142, 967-969.

- KLOPPENBURG, W. (1972) Wirkungen einer Kombination von Cyclophosphamid und Actinomycin D auf Rattenembryonen. Dissertation FU Berlin.
- KNÜRR, K., KNÜRR-GÖRTHNER, H., OBELE-KALLHARDT, B. (1969) Zur Frage der Wirkung alkylrierender Substanzen auf die Entwicklung der Frucht. Geburtsh. Frauenheilk. 29, 601-611.
- KÜHLER, E., MERKER, H.-J. (1972) Studies on the teratogenic phase specificity of actinomycin D in the rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 275, 31-44.
- KÜHLER, E., MERKER, H.-J. (1973) Effect of cyclophosphamide pretreatment of pregnant animals on the activity of nuclear DNA-dependent RNA-polymerases in different parts of rat-embryos. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 277, 71-88.
- KREYBIG, Th. von, (1965) Extremitätenmißbildungen im Tierexperiment. Arzneimittel-Forsch. 15, 1213-1215.
- KREYBIG, Th. von, (1965) Die teratogene Wirkung von Cyclophosphamid während der embryonalen Entwicklungsphase bei der Ratte. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 252, 172-195.
- KREYBIG, Th. von, SCHMIDT, W. (1967) Chemisch induzierte Fetopathien bei der Ratte. Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Cyclophosphamid und N-Methyl-N-nitroso-Harnstoff nach der Gabe am 15. oder 16. Tag der Gestation. Arzneimittel-Forsch. 17, 1093-1100.

LAZLO, J. MILLER, D. S., Mc CARTY, K. S., HOCHSTEIN, P.

Actinomycin D: Inhibition of respiration and glycolysis. *Science* 151, 1007-1010.

MOLLER, W. CROTHERS, D. M. (1968) Studies on the binding of actinomycin and related compounds to DNA.

J. molec. Biol. 35, 251-290.

NEUBERT, D., MERKER, H. J., KÜHLER, E., KROWKE, R., BARRACH, H. J.

(1970) Biochemical aspects of teratology.

Adv. Biosciences 6, (1970) 595-622.

NEUBERT, D. (1968) Beeinflussung des Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsels durch Pharmaka.

Internist, 7, 435-454.

PERRY, R. P. (1963) Selective effects of actinomycin D

on the intracellular distribution of RNA synthesis in tissue culture cells.

Exp. Cell Res. 29, 400-406.

PIERRO, L. J. (1961) Teratogenic action of actinomycin D in the embryonic chick.

J. exp. Zool. 147, 203-210.

POZHEDEJEV, E. A. (1969) Some characteristics of embryogenesis following administration of actinomycin

D treated rat embryos. *Anat. Rec.* 168, 549-550.

PREMPREE, T., MERZ, T. (1969) Actinomycin D: Inhibition of chromosomal repair in human lymphocytes.

Mutation Res. 7, 126-128.

- REVEL,M.,HIATT,H.H.,REVEL,J.-P. (1964) Actinomycin D:
An effect on rat liver homogenates unrelated
to its action on RNA synthesis.
Science 146, 1311-1319.
- SAWICKY,S.G.,GODMAN,G.C. (1971) On the differential
cytotoxicity of actinomycin D.
J. Cell Res. 50, 746-761.
- SCHMIDT,W. (1967) Mikroskopische Untersuchungen an
experimentell erzeugten Mißbildungen der
Ratte. Anatom.Anzeiger 120,Erg.-Heft, 9-13.
- SCHOLTISSEK,Chr. (1970) Unphysiological breakdown of
fast-labelled RNA by actinomycin D in
primary chick fibroblasts.
Europ. J. Biochem. 28, 70-73.
- SINGH,S.,SANYAL,A.K. (1974) Abnormal patterns of ossifi-
cation in the hands of foetuses produced by
cyclophosphamide administration to pregnant
rats.Acta anat. 89, 121-133.
- SKALKO,R.G.,MORSE,J.M.†. (1969) The differential
response of the early mouse embryo to
actinomycin D treatment in vitro.
Teratology 2, 47-57.
- SOBELL,H.M.,JAIN,S.C. Stereochemistry of actinomycin D
binding to DNA II. Detailed molecular model
of actinomycin-DNA-complex and its implications.
J. molec. Biol. 68, 21-34.

WIESNER,R.,AUS,G.,REICH,E.,SCHAFI,A., (1963)

Degradation of ribonucleic acid in mouse
fibroblasts treated with actinomycin.

J.molec. Biol. 27, 47-52.

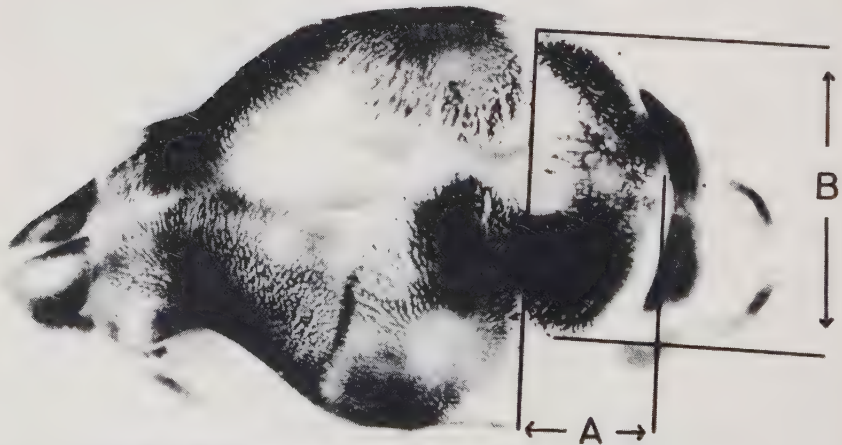
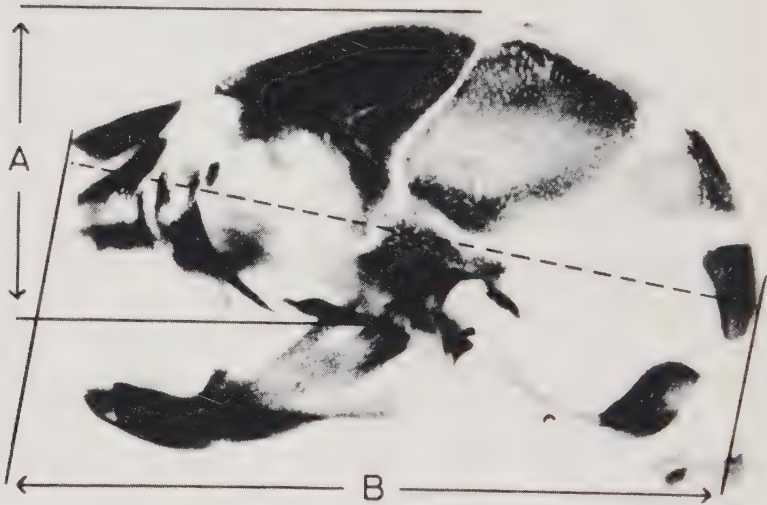
WILSON,J.G. (1965) Embryological considerations in teratology. N.Y.Acad.Sci. 123, 219-227.

WOLKOWSKI,R.M. (1970) Effect of actinomycin D on early
axial development in chick embryos.

Teratology 3, 389-398.

7. Bildanhang

SCHÄDEL v. Rattenembryo SW69 21.Tag p.c.
(A=Höhe, B=Länge)



OS INTRAPARIETALE (A=Länge, B=Breite)

Herrn Prof. Dr. med. Milan Pospisil danke ich vielmals
für die Überlassung des Themas dieser Arbeit.

LEBENS LAUF.

Am 16.11.46 wurde ich als Sohn des Dipl.-Chemikers und Apothekers Dr. Hans-Joachim Siegert und seiner Ehefrau Edeltraut in Königsutter geboren.

1950 Umzug von dort nach Helmstedt, wo ich von 1952 bis 1956 eine Volksschule, von 1956 bis 1966 eine naturwissenschaftliche Oberschule besuchte. Von 1966 studierte ich bis 1973 an der FU Berlin Medizin. 1973 Staatsexamen, 1975 Approbation und Umzug nach Helmstedt, wo ich am Kreiskrankenhaus den Facharzt für Innere Medizin anstrebe.

